



Bungkil kakao



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan.....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji bungkil kakao	4
Bibliografi.....	34
Gambar A.1 - Tingkat pengenceran	18
Tabel A.1 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	22
Tabel A.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/ml; 0,01 g/ml; dan 0,001 g/ml contoh.....	23
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella sp.</i>	30
Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella sp.</i>	31

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bungkil kakao* ini merupakan SNI baru.

Tujuan penyusunan standar ini adalah :

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk atau pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri pengolahan kakao dan industri pengguna bungkil kakao.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan.
3. Undang-undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemarkan Logam Berat dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
8. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat pra konsensus, dan rapat konsensus pada tanggal 19 Desember 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.

Bungkil kakao

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji bungkil kakao.

2 Acuan normatif

SNI 19-0428-1998, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

bungkil kakao (*cocoa cake*)

produk kakao yang diperoleh dari pemisahan sebagian atau seluruh lemak dari kakao nib atau kakao massa

3.2

kakao nib (*keping biji kakao*)

biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya

3.3

biji kakao

biji tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang telah dibersihkan dan dikeringkan

3.4

kakao massa

produk berupa pasta yang diperoleh dari kakao nib (*keping biji kakao*) melalui penggilingan tanpa menghilangkan kandungan lemaknya

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

Kakao nib atau kakao massa.

4.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk bungkil kakao sesuai dengan ketentuan berlaku.

5 Syarat mutu

Tabel 1 - Syarat mutu bungkil kakao

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal (khas bungkil kakao)
1.2	Rasa	-	normal (khas bungkil kakao)
1.3	Warna	-	Coklat sampai dengan hitam
2	Kandungan kulit (berdasarkan bahan kering bebas lemak) (b/b)	%	maks. 1,75
3	Kadar air (b/b)	%	maks. 5,0
4	Cemaran logam		
4.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
4.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,5
4.3	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
4.4	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
5	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 1,0
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^4
6.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
6.3	<i>Salmonella sp.</i>	-	negatif/ 25 g
6.4	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. 1×10^2

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 19-0428-1998.

7 Cara uji

Cara uji untuk bungkil kakao seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1.
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2.
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1.
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2.
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3.
- Cara uji kandungan kulit (berdasarkan bahan kering bebas lemak) sesuai Lampiran A.3.
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.4.
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.5.
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.5.1.
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.5.2.
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.5.3.
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.6.
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.7.

- Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.7.1.
- Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.7.2.
- Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.7.3.
- Cara uji *Salmonella sp.* sesuai Lampiran A.7.4.
- Cara uji kapang dan khamir sesuai Lampiran A.7.5.

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 4.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Bungkil kakao dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A (normatif)

Cara uji bungkil kakao

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

Buka kemasan bungkil kakao secara aseptik kemudian aduk dan ambil contoh bungkil kakao sebanyak 400 g untuk uji mikrobiologi. Pindahkan ke dalam botol contoh bersih, steril, dan tertutup rapat. Aduk kembali dan ambil contoh bungkil kakao secukupnya untuk uji organoleptik kemudian pindahkan ke dalam botol contoh bersih dan tertutup rapat. Aduk kembali dan ambil contoh bungkil kakao sebanyak 500 g untuk analisis kimia kemudian pindahkan ke dalam botol contoh bersih dan tertutup rapat.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman.

A.2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji yang sudah dipersiapkan secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering,
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya, dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas bungkil kakao, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika tercium selain bau khas bungkil kakao, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera pengecap.

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji yang sudah dipersiapkan secukupnya dan rasakan dengan lidah, dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa rasa khas bungkil kakao, maka hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika terasa selain rasa khas bungkil kakao, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji yang sudah dipersiapkan secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering,
- b) amati warna contoh uji, dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna coklat, maka hasil dinyatakan “normal”; dan
- b) jika terlihat warna selain coklat, maka disebutkan warna yang diamati dan hasil dinyatakan “tidak normal”.

A.3 Kandungan Kulit (berdasarkan bahan kering bebas lemak)

A.3.1 Prinsip

Destruksi senyawa organik yang terdapat didalam contoh uji tanpa mendestruksi sel-sel keras (*stone cells*) menggunakan pereaksi Bellucci yang dididihkan selama 10 menit. Sel-sel keras dipisahkan dengan cara sentrifugasi kemudian disuspensikan dalam gliserol. Jumlah kelompok sel-sel keras dan jumlah sel keras dalam tiap kelompok diamati dan dihitung dengan menggunakan mikroskop. Kandungan kulit dihitung dengan cara penetapan empirik kurva kalibrasi yang menyatakan hubungan antara banyaknya kelompok sel keras dan ukuran rata-rata kelompok contoh uji dengan kandungan kulit 1 % yang diukur dalam bahan kering bebas lemak.

A.3.2 Peralatan

- a) Mikroskop;
- b) *counting grid* berukuran $\pm (33 \times 33 \times 0,2)$ mm;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) sentrifus;
- e) oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- f) penangas air;
- g) tabung kultur;
- h) tabung kaca berujung lancip, diameter dasar ± 5 mm, diameter atas 1 mm, dan panjang 150 mm;
- i) kaca objek berukuran $\pm (75 \times 38 \times 0,5)$ mm; dan
- j) gelas piala.

A.3.3 Pereaksi

- a) Pereaksi Bellucci;
(asam asetat glasial : HNO_3 pekat : air suling = 36 : 5 : 9)
- b) gliserol; dan
- c) eter.

A.3.4 Cara kerja

A.3.4.1 Menghilangkan lemak

- a) Gerus bungkil kakao dengan menggunakan mortar hingga halus dan saring menggunakan saringan 30 mesh,
- b) timbang 15 g bungkil kakao yang telah disaring ke dalam tabung sentrifus 250 ml,
- c) tambahkan 100 ml eter untuk ekstraksi lemak,
- d) tutup tabung dan kocok hingga lemak larut dalam eter kemudian saring,
- e) cuci saringan dengan eter,
- f) larutan kemudian di sentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm dan supernatan dibuang,
- g) tambahkan 100 ml eter untuk ekstraksi kembali dan lakukan sesuai dengan A.3.4.1.d,
- h) tambahkan 100 ml eter, tabung ditutup, dan kocok,
- i) segera tuangkan ke dalam labu *rotary evaporator* dan lakukan evaporasi eter selama lebih kurang 20 menit hingga kering,
- j) pindahkan seluruh residu ke dalam mortar menggunakan sudip atau sendok yang bersih dan kering kemudian gerus hingga halus,
- k) setelah halus, pindahkan kembali ke pinggan alumunium atau porselin dan keringkan selama 10 menit sampai dengan 15 menit dalam penangas air untuk menghilangkan sisa eter, dan
- l) keringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 1 jam sehingga diperoleh bungkil kakao kering bebas lemak.

A.3.4.2 Menghitung kandungan kulit

- a) Timbang dengan teliti 0,500 g (W) bungkil kakao kering bebas lemak ke dalam gelas piala 150 ml,
- b) tambahkan 20 ml pereaksi Bellucci secara perlahan dan sambil diaduk,
- c) bilas dinding gelas piala dengan sisa pereaksi Bellucci apabila ada bungkil kakao yang menempel,
- d) didihkan selama 10 menit sambil sesekali diaduk kemudian dinginkan selama ± 5 menit,
- e) timbang tabung kultur yang berada di dalam gelas piala 30 ml yang berfungsi sebagai penyangga,
- f) pindahkan residu secara hati-hati ke dalam tabung kultur dengan sedikit penambahan air dan sentrifugasi pada kecepatan penuh selama lebih kurang 3 menit,
- g) buang cairan supernatan, tambahkan air suling hingga $\frac{3}{4}$ volume tabung, tutup tabung dan kocok sampai residunya terdispersi dalam larutan kemudian sentrifugasi kembali pada kecepatan penuh selama lebih kurang 3 menit,
- h) buang kembali supernatan-nya dan tambahkan larutan gliserol (gliserol : air = 3 : 1) hingga isi tabung dan penyangganya berbobot $(20 \pm 0,03)$ g (L),
- i) kocok dengan kuat sampai benar-benar tercampur dan pindahkan ke botol berisi batang magnet kecil, biarkan botol selama 5 menit sampai 10 menit hingga gelembungnya hilang,
- j) timbang secara bersamaan *slide* kaca berskala dan tutupnya,
- k) aduk larutan dalam botol menggunakan pengaduk magnet selama 1 menit pada kecepatan maksimum hingga tidak terbentuk gelembung,

- l) pindahkan tetesan larutan dengan menggunakan sendok ($0,04 \pm 0,01$) g (D) ke bagian tengah *slide* kaca, tempatkan penutupnya diatas *slide* sehingga larutan akan bergerak ke pinggir *slide*, jangan sampai menekan penutupnya,
- m) timbang *slide* hingga 0,1 mg,
- n) tutup botol dengan penutup karet untuk mencegah evaporasi,
- o) tempatkan *slide* pada mikroskop dan hitung *stone cell* dengan cara *scan slide* 100 kali dan hitung *stone cell* pada ≥ 200 kali,
- p) hitung seluruh *stone cell* baik yang menyendiri maupun berkelompok, ataupun yang sudah rusak dengan ukuran sel $\geq 0,5$ (C) , jangan menghitung fragmen kecil,
- q) lakukan pengamatan dengan mikroskop sebanyak dua kali untuk setiap pekerjaan, dan
- r) lakukan pekerjaan duplo.

A.3.5 Perhitungan

$$\text{Bobot bungkil kakao dalam tetesan larutan (M) (mg)} = 1000 \frac{WD}{L}$$

$$\text{Kandungan kulit (S) (\%)} = \frac{84 C}{17200M - C}$$

Keterangan:

- W adalah bobot bungkil kakao kering bebas lemak, dinyatakan dalam gram (g);
- L adalah bobot larutan bungkil kakao kering bebas lemak, dinyatakan dalam gram (g);
- D adalah bobot tetesan larutan yang dihitung, dinyatakan dalam gram (g);
- M adalah bobot bungkil kakao kering bebas lemak dalam tetesan larutan, dinyatakan dalam miligram (mg);
- C adalah jumlah *stone cell* dalam tetesan cairan; dan
- S adalah kandungan kulit, dinyatakan dalam persen (%);

A.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kandungan kulit. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4 Kadar air

A.4.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu (100 ± 2) °C.

A.4.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) desikator yang berisi desikan; dan
- d) pinggan nikel, platina atau aluminium bertutup.

A.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan pinggan beserta tutupnya dalam oven pada suhu (100 ± 2) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (pinggan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1),

- c) panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 3 (tiga) jam setelah suhu oven $(100 \pm 2) ^\circ\text{C}$,
- d) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 sampai dengan 30 menit kemudian timbang,
- e) lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan ulangi kembali sampai perubahan bobot antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval $\leq 2 \text{ mg}$ (W_2),
- f) lakukan pekerjaan duplo, dan
- g) hitung kadar air dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Cemarkan logam

A.5.1 Penetapan cemarkan logam kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.5.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada $450 ^\circ\text{C}$ yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.5.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) penangas listrik;
- e) penangas air;
- f) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 10 ml; dan
- i) gelas piala 250 ml.
- j) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- k) wadah *polypropylene*;
- l) kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 – 25 μm ;

A.5.1.3 Pereaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- c) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- f) larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
pipet 10 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- g) larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ Cd;
pipet 10 ml larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- h) larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,2 $\mu\text{g/ml}$; 0,4 $\mu\text{g/ml}$; 0,8 $\mu\text{g/ml}$; 1,4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1,8 $\mu\text{g/ml}$ Cd.
- i) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- j) larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/ml}$.
- k) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Pb.

A.5.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselin/ platina/ kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 1 ml sampai dengan 3 ml;

- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 450 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 – 25 µm ke dalam wadah *polypropylene*;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb,
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C), dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.5.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 M adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5.2 Penetapan merkuri (Hg)

A.5.2.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.5.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) penangas listrik;
- d) labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi; dan
- f) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- g) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- h) gelas ukur 25 ml.

A.5.2.3 Pereaksi

- a) Asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- b) asam nitrat, HNO_3 7 M;
- c) batu didih;
- d) campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- e) hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- f) larutan natrium molibdat 2 %.
- g) larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) larutan pengencer;
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
- l) larutan baku kerja Hg;
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.

A.5.2.4 Cara kerja

A.5.2.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 9 M, 20 ml HNO_3 7 M, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 batu didih sampai dengan 6 butir batu didih,
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit,
- c) tambahkan 20 ml campuran HNO_3 – HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan,
- e) tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan,
- f) didihkan lagi selama 10 menit,
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang,
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V),
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis,

- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG",
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm,
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- o) lakukan pengerjaan duplo, dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.5.2.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat,
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat,
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V),
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG",
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm,
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- i) lakukan pengerjaan duplo, dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.5.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/ml}$)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g); dan
- fp adalah faktor pengenceran.

A.5.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan raksa (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.5.3 Penetapan timah (Sn)

A.5.3.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.5.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas listrik;
- penangas air;
- pipet ukur berskala 0,1 ml kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- erlenmeyer 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- gelas ukur kapasitas 50 ml; dan
- gelas piala 250 ml.

A.5.3.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K; larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- asam klorida pekat, HCl pekat;
- larutan baku 1000 mg/l Sn; dan larutkan 1000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku kerja Sn.
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

A.5.3.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit,
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan,
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang,
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti,
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml,
- tambahkan 40 ml air suling (V), aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling,
- tambahkan 1,0 ml KCl , dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling dan saring,
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,

- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$,
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu g/ml$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- l) lakukan pengerjaan duplo, dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.5.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu g/ml$)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Cemarkan arsen (As)

A.6.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.6.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) labu borosilikat berdasar bulat 50 ml;
- f) labu Kjeldahl 250 ml;
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- h) pipet volumetrik 25 ml;
- i) cawan porselen kapasitas 50 ml;
- j) gelas ukur 25 ml; dan
- k) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

A.6.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam perklorat, $HClO_4$ pekat;
- c) natrium boronhidrida, $NaBH_4$;
 larutkan 3 g $NaBH_4$ dan 3 g $NaOH$ dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) asam klorida, HCl 8 M;

- larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
 - kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
 - Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
Larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
 - larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
 - larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1 000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
 - larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
 - larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

A.6.4 Cara kerja

A.6.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman,
- tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat),
- dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml amonim oksalat jenuh,
- panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu,
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V),
- pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit,
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh,
- tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG",
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm,
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,

- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- m) lakukan pengerjaan duplo, dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.6.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat,
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V),
- d) pipet 10 ml larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam),
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat,
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat,
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh,
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi,
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y,
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C),
- k) lakukan pengerjaan duplo, dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.7 Cemarkan mikroba

A.7.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total, *Escherichia coli*, kapang, dan khamir

A.7.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi

yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.7.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10.000 rpm sampai dengan 12.000 rpm;
- penangas listrik;
- neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi.
- gelas piala steril;
- labu erlenmeyer steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi; dan
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

A.7.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - air suling | 500 ml |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 ml dan ke dalam tabung reaksi sebanyak (9±1) ml dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.7.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.7.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)

A.7.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.7.2.2 Peralatan

- Lemari pengeram (inkubator) terkalibrasi;
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- otoklaf;
- alat penghitung koloni (*colony counter*);
- penangas air;
- pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml steril; dan
- cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril.

A.7.2.3 Pembenihan dan pengencer

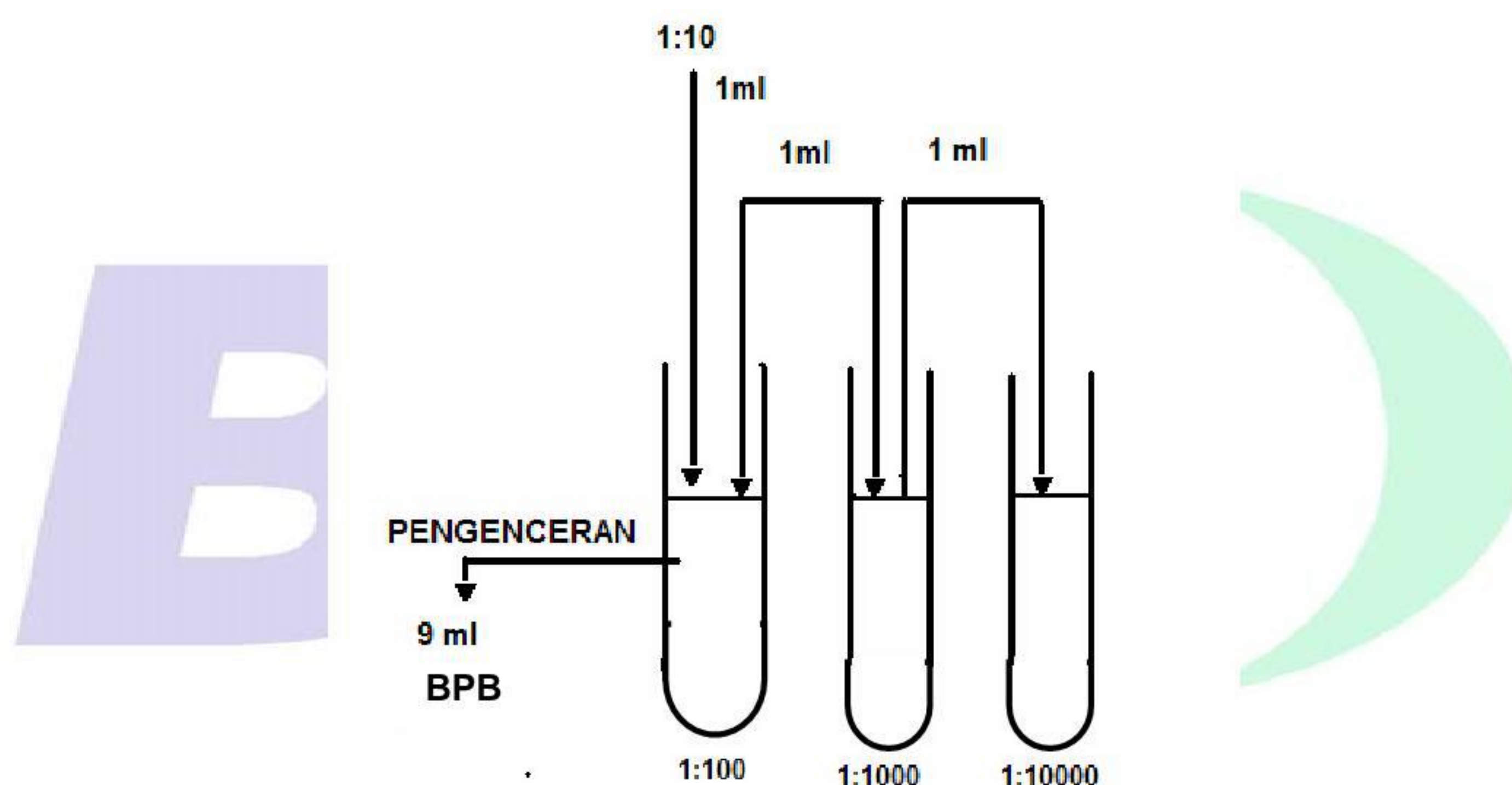
Plate count agar (PCA)

– tryptone	5 g
– yeast extract	2,5 g
– glukosa	1 g
– agar	15 g
– air suling	1 000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan *otoklaf* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.7.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti diperlihatkan pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water*,



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran

- b) pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo,
 c) tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri,
 d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat,
 e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa,
 f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat,
 g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam, dan
 h) catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.7.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.7.2.6 Pernyataan hasil**A.7.2.6.1 Cara menghitung**

- a) pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni – 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm ²)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000$ ($6,5 \times 10^6$)
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000$ ($5,9 \times 10^6$)

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.7.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.7.3 *Escherichia coli*

A.7.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel A.2.

A.7.3.2 Peralatan

- a) lemari pengering (Inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- b) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- c) rak untuk tabung reaksi;
- d) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala; dan
- e) botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) tabung reaksi;
- g) tabung Durham.
- h) jarum ose (inokulasi), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- i) cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;

A.7.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2 %;
- c) *EC broth*;

- d) *Levine's eosin methylene blue* (L-EMB) agar;
- e) *plate count agar* (PCA);
- f) *gram stain*;
- g) *tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *pereaksi kovacs*';
- i) *MR - VP broth*;
- j) *pereaksi voges proskauer*;
- k) *larutan methyl red*;
- l) *koser's citrate broth*;
- m) *peptone diluents* 0,1 %;
- n) *pereaksi indole*;
- o) *larutan kalium hidroksida* 40 %;
- p) *buffer fields phosfat buffered dilution water*;
- q) *alpha naphthol*, dan
- r) *creatine monohydrate crystal*.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 APM – Uji Pendugaan untuk *Escherichia coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.7.1,
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *LST broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya,
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam,
- d) amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif",
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam,
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif", dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.7.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu mata ose dari setiap tabung *LST* yang positif ke dalam tabung *EC broth* yang berlainan,
- b) Inkubasikan tabung-tabung *EC* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada $(45,5 \pm 0,2)$ °C, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif", dan
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.7.3.4.3 Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung *EC* yang positif secara hati-hati,
- b) digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
- c) inkubasikan piringan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada (35 ± 1) °C,

- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna hijau dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang mencurigakan pada tabung agar miring PCA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada 35 °C,
 - uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *Kovacs'*, dan
 - uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada 35 °C,
 - secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 ml larutan 5 % dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam,
 - uji *Methyl red*
 - Setelah uji VP, inkubasikan kembali tabung MR-VP selama 48 jam pada 35 °C,
 - tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* pada setiap tabung, dan
 - biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - penggunaan Sitrat
 - Dengan hati-hati tabung *Koser's citrate broth* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C, dan
 - adanya pertumbuhan dalam tabung yang ditunjukkan dengan warna keruh menandakan uji yang positif.
 - Pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.7.3.4.3.1 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	<i>Methyl Red</i>	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
<i>Escherichia coli</i>				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora yang membentuk gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C

- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/ml; 0,01 g/ml; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

A.7.4 *Salmonella sp.*

A.7.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp.*

A.7.4.2 Peralatan

- inkubator, $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator*, $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$
- otoklaf;
- oven;

- e) penangas air, $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- f) penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(43 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- g) penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- h) neraca, kapasitas 2000 gram, dengan ketelitian 0,1 gram;
- i) neraca, kapasitas 120 gram, dengan ketelitian 5 mg;
- j) blender dengan kecepatan putaran 10.000-12.000 rpm dan blender jar (botol) steril;
- k) botol bertutup ulir bermulut lebar 16 oz (500 ml) steril, Erlenmeyer 500 ml steril, *beaker*, 250 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastic;
- o) pipet steril, 1ml dengan ketelitian 0,01 ml; dan pipet steril 5 dan 10 ml dengan ketelitian 0,1 ml;
- p) jarum ose (inokulasi) (diameter ± 3 mm), *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) tabung reaksi atau tabung kultur steril, 10 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- r) rak tabung reaksi atau rak tabung kultur;
- s) vorteks mixer;
- t) gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril;
- u) lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- v) *fisher* atau *bunsen burner*;
- w) kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimum 0,4 unit pH per perubahan warna;
- x) pH meter;
- y) kantong plastik steril, 28-37 cm dapat diikat;
- z) *beaker* plastik, 4 liter, dapat diotoklaf, untuk menyangga kantong plastik selama pengocokan dan inkubasi;
- aa) *sponges, non-bactericidal* (Nasco cat # B01299WA) atau yang sebanding; dan
- bb) *swab, non bactericidal*, jenis kapas.

A.7.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose broth*;
- b) *tetrathionate (TT) broth*;
- c) *Rappaport-Vassiliadis (RV) medium* (*RV medium* harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi *RV medium* tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) *xylose lysine desoxycholate (XLD) agar*;
- e) *hektoen enteric (HE) agar*;
- f) *bismuth sulfite (BS) agar*;
- g) *triple sugar iron (TSI) agar*;
- h) *tryptone (tryptophane) broth*;
- i) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- j) *trypticase soy broth* dengan *ferrous sulfate*;
- k) *trypticase soy-tryptose broth*;
- l) *methyl red-Voges Proskeaur (MR-VP) broth*
- m) *simmons citrate agar*;
- n) *urea broth*;
- o) *urea broth (rapid)*;
- p) *malonate broth*;
- q) *lysine iron agar (LIA)* (Edward dan Fife)
- r) *lysine decarboxylase broth*;
- s) medium uji motilitas (semi padat);

- t) *potassium cyanide (KCN) broth*;
- u) *phenol red carbohydrate broth*;
- v) *purple carbohydrate broth*;
- w) *MacConkey agar*;
- x) *nutrient broth*;
- y) *brain heart infusion (BHI) broth*;
- z) larutan papain, 5 %;
- aa) larutan selulosa, 1 %;
- bb) *tryptose blood agar base*;
- cc) bubuk *potassium sulfite, anhydrous*;
- dd) larutan chlorine, 200 ppm, mengandung 0,1 % *sodium dodecyl sulfate*;
- ee) etanol 70 %;
- ff) pereaksi Kovacs;
- dd) pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- hh) kristal *creatine phosphate*;
- ii) larutan *potassium hydroxide*, 40 %;
- jj) larutan *sodium hydroxide* 1 N;
- kk) asam hidroklorat 1 N;
- ll) larutan *brilliant green dye*, 1 %;
- mm) larutan *bromcresol purple dye*, 0,2 %;
- nn) indikator *methyl red*;
- oo) air suling steril;
- pp) *tergitol anionic*;
- qq) *triton X-100*;
- rr) larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ss) larutan *formalinized physiological saline*;
- tt) *Salmonella polyvalent somatic (O) antiserum*;
- uu) *Salmonella polyvalent flagellar (H) antiserum*;
- vv) *Salmonella somatic group (O) antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai;
- ww) *Salmonella Spicer-Edwards flagellar (H) antisera*;

A.7.4.4 Cara Kerja

A.7.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh secara aseptik kedalam botol 500 ml steril dan tambahkan 225 ml *lactose broth* steril;
- b) kocok dengan hati-hati dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan botol dalam keadaan tertutup;
- c) kocok dengan memutar-mutar botol secara hati-hati dan tentukan pH menggunakan kertas pH;
- d) jika diperlukan, atur pH dengan menambahkan 2,25 ml tergitol anionic 7 menjadi $(6,8 \pm 0,2)$;
- e) pengaturan pH juga dapat dilakukan dengan menambahkan 2 sampai dengan 3 tetes triton X-100;
- f) kendurkan tutup wadah secukupnya (kira-kira $\frac{1}{4}$ putaran) dan inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.7.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi,

- b) pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 ml media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 ml *tetrathionate* (TT) broth dan vorteks masing-masing campuran tersebut, dan
- c) inkubasikan media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) pada suhu $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan *tetrathionate* (TT) broth pada $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

A.7.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TT ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores,
- b) ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV,
- c) inkubasikan cawan-cawan berisi media BSA, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, dan
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp.*
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp.* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp.* adalah sebagai berikut:
 XLD : koloni berwarna merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella sp.* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.
 HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas,
- f) dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 \pm 8) ^\circ\text{C}$,
- g) inkubasi TSI dan LIA pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk H_2S pada agar miring LIA, Beberapa kultur non *Salmonella sp.* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA,
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp.* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan

pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp.* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada goresannya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp.* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas,

- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV,
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.7.4.5 Identifikasi *Salmonella sp.*

A.7.4.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali kedalam media *MacConkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella sp.* :
 - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp.* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh,
 - *hektoen enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam,
 - *xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah jambu (*pink*) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella sp.* pada media TSI dan LIA seperti ditentukan dalam A.7.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.7.4.4.3.g

A.7.4.5.2 Kultur murni

- a) uji urease (konvensional)
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *Urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C , dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inokulasikan 2 jam dalam water bath pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella sp.* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

A.7.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *lysine Decarboxylase Broth* (LDB)
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp.* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna

- kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya,
- b) *phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*, dan Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *tryptone (tryptophane) broth* (TB),
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
- *Potasium Cyanida (KCN) broth*
Pindahkan 1 ose biakan dari TB 24 jam kedalam media *KCN broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella sp.* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *malonate broth*
Pindahkan 1 ose dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - uji indol
Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *kovacs'*. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.
- Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella sp.* bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif.

A.7.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
- *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35°C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau
 - *Trypticase Soy Tryptose Broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas,
- b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella sp. polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ ml larutan *saline Salmonella sp. polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48°C sampai dengan 50°C . Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol,

- negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol, dan
- non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.7.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- Gunakan pensil lilin, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan,
- emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85 % saline menggunakan jarum ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah),
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin,
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain,
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit, dan
- klasifikasi tes *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan,
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran tes, dan kontrol *saline*,
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes dan pada kontrol *saline*.

A.7.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella sp.*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel A.3 nomor 1 sampai 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella sp.*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella sp.* pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.7.4.5.1 diatas dan uji kembali seperti ditentukan dalam A.7.4.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*
Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam,
 - Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
 - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*,
- Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*
Ikuti prosedur sesuai dengan A.7.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA,
- Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

- Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ,
- Tambahkan 0,6 ml alpha naphthol dan aduk,
- Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam, dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi VP negatif, Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes indikator merah metil kedalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam,
- amati hasilnya dengan segera, dan
- umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif, Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif

d) *Simmons citrate agar*

- Inokulasi media dengan menggunakan jarum ose yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ,
- positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil uji sitrat positif
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna

A.7.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp.* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella sp.* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari A.7.4.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella sp.*

No.	Uji atau substrat	Hasil reaksi		<i>Salmonella sp.</i> reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak terbentuk gas, tidak ada perubahan warna	+ ^b
7.	KCN <i>broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>malonate broth</i>	warna biru	tidak ada perubahan warna	- ^c

Tabel A.3 (lanjutan)

No.	Uji atau substrat	Hasil reaksi		<i>Salmonella sp.</i> reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
9	<i>indole test</i>	permukaan warna nila	permukaan warna kuning	-
10	<i>polyvalent flagellar test</i>	penggumpalan	tidak ada penggumpalan	+
11	<i>polyvalent somatic test</i>	penggumpalan	tidak ada penggumpalan	+
12	<i>phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak terbentuk gas dan tidak ada perubahan warna	- ^c
13	<i>phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak terbentuk gas dan tidak ada perubahan warna	-
14	<i>voges-proskauer test</i>	merah muda sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
15	<i>methyl red test</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16	<i>simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan tidak ada perubahan warna	v
Keterangan: ^a + : 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari; - : 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari; v : variabel ^b : mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : negatif ^c : mayoritas dari kultur <i>Salmonella arizonae</i> : positif				

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella sp.*

No	Uji atau substrat	Hasil
1	<i>urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	<i>Indole test</i> dan <i>polyvalent flagellar (H) test</i>	positif (warna nila pada permukaan) negatif (tidak ada penggumpalan)
	atau <i>Indole test</i> dan <i>Spicer-Edwards flagellar test</i>	positif (warna nila pada permukaan) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	negatif (warna kuning) positif (ada pertumbuhan)
4	<i>phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau ada gas) ^{a,b}
5	<i>phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau ada gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , <i>Voges-proskauer test</i> dan <i>methyl red test</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a : test <i>malonate broth</i> positif jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> ^b : jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella sp.</i> , uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella sp.</i>		

A.7.5 Kapang dan khamir

A.7.5.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.7.5.2 Peralatan

- Inkubator $25 ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- otoklaf;
- penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- alat penghitung koloni;
- mikroskop;
- cawan petri 15 mm x 100 mm; dan
- pipet ukur 1 ml dan 10 ml.

A.7.5.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- Media dengan penambahan larutan antibiotik,
 - dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar,
 - dichloran 18 % glycerol* (DG 18) agar,
 antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.
- plate count agar* (PCA);
tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang menyebar (contoh *Mucor*, *Rhizopus* dll);
- malt agar* (MA);
- malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM); atau
- potato dextrose agar* (PDA):

- infusi dari kentang putih	200 g
- dextrose	20 g
- agar	20 g
- air suling	1 000 ml

Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai $50 ^\circ\text{C}$ dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

A.7.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.7.1,
- terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
 - metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):
pipet 0,1 ml masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebar merata dengan menggunakan batang gelas.
 - metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):
pipet 1,0 ml masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 ml sampai dengan 25 ml media. Campurkan

- dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku,
 - d) pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-2} ke dalam cawan petri steril secara duplo,
 - e) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25°C selama 5 hari,
 - f) hitung koloni kapang dan khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai dengan hari ke lima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam, dan
 - g) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang dan khamir per gram contoh.

A.7.5.5 Pernyataan hasil

A.7.5.5.1 Cara menghitung

Cara menghitung kapang/khamir seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

A.7.5.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang dan khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 970.20, Cacao Products, Preparation of Laboratory Sample*, 18th Edition, Chapter 31.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 963.15, Fat in Cacao Products: Soxhlet Extraction Method*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 931.04, Moisture in Cacao Products, Gravimetric Method*, 18th Edition, Chapter 31.1.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 970.23, Stone Cell and Group Count of Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.2.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Kategori Pangan. 2006. Kategori Pangan 05.0.
- CODEX Alimentarius Commission. 2001, *CODEX Standard for Cocoa (Cacao) Mass (Cocoa/Chocolate Liquor) and Cocoa Cake*. CODEX STAN 141-1983, Rev. 1-2001
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Echerichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2006. *Salmonella sp.*. Chapter 5.





BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id